

(6)

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 77 28161

(54) Nouveau matériau poreux pour chromatographie, sa préparation et son application.

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). G 01 N 31/08, 33/16.

(22) Date de dépôt 19 septembre 1977, à 15 h.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 15 du 13-4-1979.

(71) Déposant : Société anonyme dite : INSTITUT MERIEUX, résidant en France.

(72) Invention de : Michel Tardy et Jean-Louis Tayot.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Michel Nony, Conseil en brevets d'invention, 29, rue Cambacérès, 75008 Paris.

La présente invention a pour objet un nouveau matériau capable de fixer de façon réversible des antigènes, ainsi que leur procédé de préparation.

On a déjà proposé dans la demande de brevet français N°
5 76.23176 de fixer par réticulation des antigènes ou des anticorps à la surface du diéthylaminoéthyl-dextran ou de tout autre polysaccharide cationique lui-même réticulé tapissant la surface d'un support minéral poreux.

La présente invention constitue une méthode plus simple pour
10 revêtir des supports minéraux poreux d'une couche d'anticorps solidement et définitivement fixée.

Contrairement à la plupart des autres protéines ou antigènes, les anticorps présentent une affinité forte et spontanée pour la silice et pour d'autres supports minéraux poreux à caractère électro-négatif. Cette affinité naturelle n'est pas seulement
15 de nature électrostatique, car il est très difficile d'éluer les anticorps ainsi adsorbés même par variation de force ionique ou de pH. On a maintenant découvert que la couche intermédiaire de DEAE Dextran en surface de la silice, qui était nécessaire pour
20 attirer puis réticuler des antigènes, n'est pas indispensable pour la fixation des anticorps.

L'immobilisation d'anticorps selon le procédé de l'invention sur des silices ou supports minéraux poreux vierges, non transformés chimiquement n'a jamais été décrite. En effet généralement,
25 une première couche d'imprégnation par des silanes aminés notamment le gamma-aminopropyltriéthoxysilane était réputée nécessaire et semble avoir été toujours utilisée. On a découvert de façon surprenante que cette couche est inutile et même néfaste car elle diminue l'affinité naturelle des anticorps pour la
30 surface du support minéral poreux.

Les anticorps à fixer sur le support minéral poreux peuvent être préparés de façon classique en immunisant des animaux avec une préparation antigénique et en isolant ultérieurement les anticorps formés selon les méthodes connues.

La présente invention a pour objet un matériau solide poreux utilisable dans des colonnes de séparation chromatographique caractérisé par le fait qu'il est constitué par un support minéral poreux revêtu directement par une couche d'anticorps adsorbés,
35 ladite couche d'anticorps adsorbés étant à l'état réticulé. La
40 réticulation, qui a pour but de stabiliser la couche d'anticorps

est effectuée selon les méthodes connues.

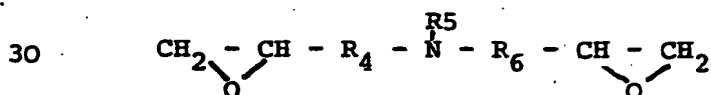
L'invention a également pour objet un procédé de préparation du matériau de l'invention, ce procédé étant caractérisé par le fait que l'on fait passer dans une colonne contenant le support
5 minéral poreux une solution d'anticorps jusqu'à saturation homogène du support minéral poreux, puis que l'on fait passer dans la colonne une solution d'agent réticulant et laisse l'agent réticulant en contact avec le support revêtu d'anticorps pendant un temps suffisant pour que la réticulation se produise.

10 Selon un mode de réalisation préféré, on rince la colonne avec une solution tampon avant de faire passer la solution d'agent réticulant.

Le support minéral poreux peut être constitué par exemple d'un oxyde métallique tel que la silice, l'alumine, la magnésie,
15 un oxyde de titane ou leurs dérivés synthétiques ou naturels tels que les verres, les silicates, les borosilicates, le kaolin, etc...

Le support minéral poreux doit avoir une porosité contrôlée bien définie. La surface interne du support est de préférence
20 inférieure ou égale à 100 m²/g et en particulier comprise entre 5 et 80 m²/g. Le diamètre moyen des pores doit être supérieur ou égal à 25 nm et en particulier compris entre 50 et 1.000 nm.

L'agent réticulant peut être tout agent habituellement utilisé pour réticuler les molécules de protéines. On peut utiliser
25 notamment des dérivés bifonctionnels tels que des dérivés dicarbonylés, des halohydrines, des diépoxydes, etc... On peut utiliser notamment le glutaraldéhyde, le 1,4-butanedioldiglycidyléther, l'épichlorhydrine, l'épibromhydrine, ou un diépoxyde de formule :



dans laquelle R₅ est un alkyle ayant de 1 à 20 atomes de carbone, de préférence un alkyle inférieur ayant de 1 à 4 atomes de carbone et R₄ et R₆ représentent une chaîne hydrocarbonée ayant 1 à
35 10 atomes, de préférence un radical alkylène inférieur ayant 1 à 4 atomes de carbone.

L'invention a également pour objet l'application des matériaux poreux revêtus d'anticorps à la séparation d'antigènes ou à la purification de solutions contenant des antigènes.

40 Cette application est caractérisée par le fait que l'on

réalise une colonne chromatographique à l'aide du matériau poreux revêtu d'anticorps, que l'on fait passer dans cette colonne une solution contenant de l'antigène correspondant à l'anticorps fixé sur le matériau poreux, et que, si désiré, on élue l'antigène
5 selon les méthodes usuelles.

Pour dissocier le complexe cholérage-anticorps, on sait que l'on peut opérer par élution avec une solution tampon acide, ou en présence d'une forte concentration en urée, en guanidine, en iodure (par exemple iodure de sodium), en thiocyanate (par
10 exemple SCNK) ou en présence d'autres agents chaotropiques ou dénaturants.

Grâce à cette application, on peut par exemple effectuer les opérations suivantes :

- préparer une solution d'antigènes purifiés pouvant servir
15 à la préparation d'un vaccin ;
- débarrasser une solution de toute trace d'un antigène déterminé ;
- préparer ensuite des anti-sérums vis-à-vis de ces deux types de solutions.

20 Les exemples suivants illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLE 1 - Fixation des anticorps antitoxine cholérique
Préparation des anticorps

De manière classique ces anticorps sont préparés en immunisant des animaux (lapins, moutons, chèvres ou chevaux par
25 exemple) avec une préparation de toxine cholérique de préférence purifiée.

a) une première méthode consiste à hyperimmuniser des animaux avec une solution de cholérage purifié, préparée selon la
30 méthode de FINKELSTEIN et distribuée sur demande par le National Institute of Health aux Etats-Unis ou commercialisée par la firme américaine SCHWARTZMAN.

b) une deuxième méthode consiste à hyperimmuniser des animaux avec de la toxine cholérique purifiée par chromatographie
35 d'affinité biospécifique.

c) une troisième méthode consiste à hyperimmuniser des animaux avec un vaccin à base de toxine cholérique.

d) une quatrième méthode consiste à hyperimmuniser des animaux avec du filtrat de culture de vibrions cholériques.

40 Dans cette quatrième méthode (et éventuellement dans chacune

des trois autres, si la préparation de toxine cholérique n'est pas absolument pure), les animaux synthétiseront des anticorps dirigés contre les autres protéines et antigènes du filtrat de culture, ou contre les impuretés éventuellement présentes dans
5 les préparations de toxine utilisées.

Un procédé très simple à mettre en oeuvre permet d'éliminer tous les anticorps indésirables autres que les anticorps spécifiquement dirigés contre la toxine cholérique.

En effet par chromatographie d'affinité biospécifique sur
10 des supports revêtus de ganglioside G_{M1} ou de lysoganglioside G_{M1} , il est facile de préparer un filtrat de culture de vibrions cholériques complètement débarrassé de toxine cholérique, car la toxine cholérique est la seule protéine à se fixer sur le ganglioside G_{M1} et de ce fait se trouve sélectivement éliminée.

15 Il suffit alors de mélanger dans des proportions convenables la solution du mélange de gammaglobulines non spécifiques obtenu, avec la solution de filtrat de culture débarrassé de toxine cholérique. Après incubation de 1 h à 20°C et de 15 h à +4°C, les anticorps parasites sont tous neutralisés et précipités par les
20 antigènes correspondants du filtrat de culture sans toxine cholérique. Après centrifugation et filtration de la solution ainsi purifiée, les gammaglobulines contenant les anticorps spécifiquement dirigés contre la toxine cholérique sont précipitées par addition d'une solution à 300 g/l de sulfate d'ammonium à pH 6,8.
25 Le précipité obtenu est récolté par centrifugation, dissous en tampon phosphate 0,025 M pH 6,8 et dialysé contre le même tampon. Après chromatographie d'échange d'ions sur Sphérosil imprégné de DEAE Dextran (selon la demande de brevet français N° 73.23176) dans ce même tampon, un pic non adsorbé sort directement de la
30 colonne et représente les gammaglobulines à activité spécifique antitoxine cholérique; ce pic peut éventuellement être concentré par ultrafiltration et filtré stérilement pour être conservé avant le stade de fixation sur support minéral. Un contrôle très simple en immunodiffusion permet de vérifier que cette prépara-
35 tion d'anticorps antitoxine cholérique donne une ligne de précipitation avec le filtrat de culture normal et que cette ligne de précipitation n'existe pas avec le filtrat de culture débarrassé de toxine cholérique. Ceci montre bien la spécificité des anticorps antitoxine cholérique ainsi préparés.

40 Les supports revêtus de ganglioside G_{M1} de lysoganglioside

G_{M1} peuvent être préparés de la façon suivante : on effectue un revêtement d'un support minéral poreux par un polymère polysaccharidique ou par un polysaccharide modifié (par exemple aminé), on effectue si nécessaire une réticulation pour stabiliser ce revêtement, on soumet ledit revêtement à une oxydation périodique, on fait réagir le support revêtu du polymère oxydé avec le lysoganglioside G_{M1} , puis on soumet le dérivé iminé obtenu à l'action d'un agent réducteur capable de réduire la liaison imine en liaison amine.

On obtient ainsi un support sur lequel sont fixées chimiquement des molécules de gangliosides G_{M1} ou de lysogangliosides G_{M1} .

De tels supports revêtus de gangliosides G_{M1} ou de lysogangliosides G_{M1} sont décrits en détail dans la demande de brevet français, déposée le même jour que la présente demande, et intitulée : "Nouveau matériau capable de fixer de façon réversible des macromolécules biologiques, sa préparation et son application."

Fixation des anticorps antitoxine cholérique sur support minéral poreux

10 g de Sphérosil XOC 005 sont montés en colonne et celle-ci est équilibrée par du tampon phosphate 0,025 M pH 6,8. La solution précédente d'anticorps est introduite dans la colonne et recyclée 3 fois de suite pour assurer une saturation homogène des sites adsorbants de la silice. Comme la capacité de fixation est d'environ 40 à 60 mg d'anticorps par gramme de silice, il est bon d'introduire une quantité excédentaire, par exemple de 600 mg + 10 %, soit environ 660 mg au moins de gammaglobulines dans la solution d'anticorps introduite dans la colonne.

La colonne est alors rincée par 50 ml de tampon pour éliminer les anticorps non adsorbés.

Réticulation des anticorps à la surface du support

La couche d'anticorps ainsi adsorbée est alors définitivement et irréversiblement fixée et stabilisée par réticulation avec le glutaraldéhyde par exemple.

Ainsi 100 ml d'une solution de glutaraldéhyde à 0,5 % en tampon phosphate 0,025 M de pH 6,8 sont introduits dans la colonne à un débit de 100 ml/h.

Après un temps de réaction de 1 h la colonne est rincée par le tampon phosphate pour éliminer le glutaraldéhyde en excès.

Puis les fonctions aldéhyde encore présentes sur cette couche

réticulée sont neutralisées pendant une nuit par une solution de glycocolle (20 g/l) de pH 8,2.

Après des lavages avec une solution aqueuse d'HCl 0,1 N (ou NaOH 0,1 N éventuellement) et retour en tampon de chromatographie, la colonne est alors prête à l'emploi et douée d'affinité biospécifique pour la toxine cholérique.

En suivant rigoureusement la même technique de fixation on a préparé des matériaux poreux sur lesquels sont fixés respectivement les anticorps spécifiques suivants : anti-albumine, anti-gammaglobuline, anti-alpha-foeto protéine, anti-virus herpès, anti-virus grippal, anti-virus HB_s, anti-toxine tétanique, anti-toxine diphtérique, et de préparer grâce à ces matériaux disposés dans des colonnes des solutions très purifiées des antigènes correspondants.

15 EXEMPLE 2 - Application à l'isolement et à la purification de la toxine cholérique

On sait qu'en se développant dans un milieu de culture approprié le vibron cholérique secrète une toxine appelée choléragène ou entérotoxine qui est responsable des diarrhées provoquées chez l'homme par ce germe. Après centrifugation et filtration du milieu de culture final, il est possible d'obtenir un "filtrat de culture brut" contenant la toxine cholérique mélangée à de nombreuses autres macromolécules du milieu de culture initial ou secrétées par les vibrions.

25 La toxine cholérique se transforme partiellement et progressivement en forme non toxique appelée choléragénofide. Le choléragénofide a une structure voisine de celle du choléragène, mais le choléragène possède en plus une chaîne polypeptidique A responsable de la toxicité.

30 En passant un filtrat de culture de vibrions cholériques additionné de 10 g/l de NaCl sur une colonne remplie du matériau décrit à l'exemple 1 il est facile de vérifier que le choléragène et le choléragénofide s'accrochent sur le support. En effet à condition de rester en dessous de la capacité maximale de fixation de la colonne, le filtrat obtenu en sortie de colonne est complètement dépourvu d'activité toxique mesurable par les tests connus.

Après lavage par le tampon de chromatographie pour éliminer les protéines non fixées, il est possible de récupérer le choléragène et le choléragénofide fixés, par élution avec le tampon

citrate - acide citrique 0,05 M pH 2,8. La dénaturation est apparemment négligeable puisque les rendements obtenus varient de 50 à 100 %, mesurés par les tests classiques de dosage de la toxine cholérique.

- 5 La pureté de la préparation peut être évaluée par chromatographie sur Sephadex G-200 (le choléragène donne un pic correspondant à un poids moléculaire de 84 000, le choléragénofide donne un pic correspondant à un poids moléculaire de 56 000) ou par des méthodes immunochimiques avec des antisérums de contrôle.
- 10 (Un antisérum anti-filtrat de culture ne possédant pas d'anticorps antitoxine cholérique ne doit pas donner de ligne de précipitation avec ces préparations purifiées).

Les applications possibles sont les suivantes :

- préparer une solution de choléragène et de choléragénofide purifiés pouvant servir à la préparation d'un vaccin.
- débarrasser un filtrat de culture de vibrions cholériques de toute trace de choléragène et de choléragénofide.
- préparer ensuite des antisérums vis à vis de ces deux types de solutions.

REVENDICATIONS

1. Matériau solide poreux utilisable dans des colonnes de séparation chromatographique, caractérisé par le fait qu'il est constitué par un support minéral poreux revêtu directement par
5 une couche d'anticorps adsorbés, ladite couche d'anticorps adsorbés étant stabilisée par réticulation.

2. Matériau selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le support minéral poreux est un oxyde métallique tel que la silice, l'alumine, la magnésie, un oxyde de titane, ou
10 leurs dérivés synthétiques ou naturels tels que les verres, les silicates, les borosilicates ou le kaolin.

3. Matériau selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'anticorps est choisi dans le groupe constitué par les anticorps anti-albumine, anti-gamma-globuline, anti-alpha-foeto protéine, anti-virus herpès, anti-virus grippal, anti-virus HB, anti-toxine tétanique, anti-toxine diphtérique.
15

4. Matériau selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé par le fait que l'anticorps est un anticorps anti-toxine cholérique.
20

5. Matériau selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'anticorps est réticulé par un agent habituellement utilisé pour réticuler les molécules de protéine.

25 6. Matériau selon la revendication 5, caractérisé par le fait que l'agent réticulant est un composé bifonctionnel choisi dans le groupe constitué par des dérivés dicarbonylés, les diépoxydes et les halohydrines.

7. Matériau selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'agent réticulant est le glutaraldéhyde.
30

8. Procédé de préparation du matériau tel que défini dans l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé par le fait que l'on fait passer dans une colonne contenant le support minéral poreux une solution d'anticorps jusqu'à saturation
35 homogène du support minéral poreux, puis que l'on fait passer dans la colonne une solution d'agent réticulant et laisse l'agent réticulant en contact avec le support revêtu d'anticorps pendant un temps suffisant pour que la réticulation se produise.

40 9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé par le

fait que l'on rince la colonne avec une solution tampon avant de faire passer la solution d'agent réticulant.

10. Application du matériau tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée par le fait que
- 5 l'on réalise une colonne chromatographique contenant ledit matériau, que l'on fait passer dans cette colonne une solution contenant l'antigène correspondant à l'anticorps fixé sur ledit matériau, puis que, si désiré, on élue l'antigène, fixé sur le matériau, selon les méthodes usuelles.